

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LÍVIA FRATINI DUTRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR p75^{NTR} EM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA**

LÍVIA FRATINI DUTRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR p75 EM LEUCEMIA LINFOCITICA
AGUDA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Caroline Brunetto de Farias

Porto Alegre
2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família pelas diversas formas de suporte durante os anos de graduação. Obrigada pela compreensão dos momentos de ausência e me impulsionando em direção aos meus objetivos.

Obrigada à minha orientadora Caroline Brunetto de Farias por acreditar no meu potencial e me permitir seguir meus sonhos na pesquisa. Agradeço à parceria dos meus colegas do Laboratório de Pesquisas em Câncer e Neurobiologia, que tornaram meus dias de experimento mais leves, e à equipe do Instituto do Câncer Infantil que me proporcionou aprendizados em oncologia que estão muito além dos livros.

Agradeço aos professores que semearam o pensamento crítico na minha percepção, abriram horizontes e que tornaram a ciência tão apaixonante.

Também agradeço a todos os funcionários, técnicos e servidores da UFRGS que me auxiliaram durante a graduação.

Agradeço aos meus amigos e colegas de Biomedicina por tornarem esses anos mais felizes, pelas discussões e todo aprendizado fora da sala de aula.

Muito obrigada à minha família de coração Del Puerto, por me dar suporte emocional e me mostrar novas formas de aprendizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Tumores Pediátricos	7
1.2 Leucemia Linfocítica Aguda	7
1.2.1 Características Gerais e Epidemiologia	7
1.2.2 Fatores de Risco	8
1.2.3 Diagnóstico e tratamento	8
1.3 Neurotrofinas e câncer	9
1.4 Receptor p75^{NTR}	10
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivos Gerais	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4. ARTIGO CIENTÍFICO	12
Introdução	14
Materiais e Métodos	14
Pacientes	14
Amostras de medula óssea	15
Extração de RNA e preparação cDNA	15
Reação em Cadeia de Polimerase	15
Análise Estatística	16
Resultados	16
Discussão	19
Referências	20
5. REFERÊNCIAS GERAIS	20
V. ANEXOS	
Anexo I: Termo de Consentimento Livre Esclarecido	
Anexo II: Normas de publicação da revista <i>Journal of Pediatric Hematology/Oncology</i>	

RESUMO

A leucemia linfocítica aguda é o tumor pediátrico mais comum atualmente. Apesar do sucesso de protocolos de tratamento empregados atualmente, que consideram o risco de cada paciente e adotam o protocolo ideal, cerca de 30% dos pacientes são refratários ao tratamento e aproximadamente 15% dos pacientes recidivam tardiamente. Na busca por novos fatores preditivos de resposta e terapias adjuvantes, o Receptor Neurotrófico p75 (p75^{NTR}) vêm sendo elucidado em diversos tumores. O objetivo desse estudo foi investigar o papel de p75^{NTR} em pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias linfocíticas agudas. Através da técnica de Reação em Cadeira de Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR), a expressão de p75^{NTR} de 18 pacientes foram analisados em dois momentos da quimioterapia. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre expressão de p75^{NTR} e momento da quimioterapia, gênero, idade ao diagnóstico, risco ou doença residual mínima. Espera-se aumentar o número de pacientes incluídos no estudo para melhor elucidar o papel do receptor p75^{NTR} em leucemias linfocíticas agudas.

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: Ácido desoxirribonucleico circular

D0: Diagnóstico (Dia zero)

D15: Dia quinze do período de indução do tratamento quimioterápico

D35: Dia trinta e cinco do período de indução do tratamento quimioterápico

DTT: Ditioneitol

GBTLI: Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil

INCA: Instituto Nacional de Câncer

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

p75^{NTR}: Receptor Neurotrófico p75

RCBP: Registro de Câncer de Base Populacional

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com Transcriptase Reversa.

Smlg: Imunoglobulina de superfície de membrana

TdT: Terminal Desoxinucleotidil Transferase

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores Pediátricos

É considerado tumor pediátrico qualquer neoplasia encontrada em pacientes de 1 a 19 anos de idade (INCA, 2008). A incidência de tumores pediátricos no Brasil é considerada rara: o percentual mediano observado nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) encontra-se em torno de 3%, com 12.600 novos casos de tumores infanto-juvenis em pacientes de até 19 anos, em 2016. Apesar da incidência ser considerada rara, os tumores pediátricos são a segunda causa de óbitos na infância no Brasil, ficando atrás somente de óbitos por acidentes, e representam a principal causa de morte por doença em crianças (INCA, 2016).

Tumores pediátricos diferem-se de tumores adultos por apresentarem períodos menores de latência, elevadas taxas de crescimento e invasividade e melhor resposta à quimioterapia. Embora tumores em adultos são muitas vezes relacionados fortemente a fatores de risco, como exposição à radiação ultravioleta, tabagismo, consumo de álcool e infecção por vírus, tumores pediátricos raramente apresentam algum fator etiológico envolvido. Desta forma, apenas cerca de 10 a 15% dos pacientes pediátricos apresenta histórico familiar associado ou condição genética ou congênita que favorece o desenvolvimento de tipos específicos de câncer (DeVita *et al.*, 2014).

Apesar de terapias atuais serem bem-sucedidas no tratamento oncológico, cerca de 20% dos pacientes pediátricos vão à óbito, e, entre os que sobrevivem, há sequelas permanentes decorrentes do tratamento antineoplásico (Smith *et al.*, 2010; Pritchard-Jones *et al.*, 2013). Cerca de 62% dos pacientes que tiveram câncer na infância apresentam pelo menos uma doença crônica como disritmia, hipertensão, perda auditiva, tosse crônica, fibrose pulmonar, tromboembolia, obstrução intestinal e cálculos renais (Oeffinger *et al.*, 2006).

1.2 Leucemia Linfocítica Aguda

1.2.1 Características Gerais e Epidemiologia

A leucemia é uma neoplasia que se origina na medula óssea, caracterizada pelo aumento do número de leucócitos anormais na medula óssea e no sangue. Dependendo do tipo celular de que se origina, é dividido em linfocítica ou mielocítica; e de acordo com o tempo de desenvolvimento da doença, é classificada como aguda ou crônica (Hoffbrand e Moss, 2013). A leucemia linfocítica aguda (LLA) é derivada dos linfoblastos, células encontradas amplamente na medula óssea, timo e gânglios linfáticos. Nessa condição oncológica, os linfoblastos perdem a capacidade de diferenciação e continuam proliferando, resultando no seu acúmulo em diferentes etapas da maturação, mas não na maturação normal (Hoffbrand e Moss, 2013).

A LLA se classifica nos subtipos B ou T, de acordo com análise imunofenotípica dos linfoblastos. A LLA B se subclassifica nos tipos pró B, comum, pré-B e B maduro. Já

a LLA T se subclassifica em pré-T, T intermediário e maduro (Farias & Castro, 2004). Os diversos tipos de LLA apresentam marcadores diferenciados e incidências distintas:

- LLA pró-B: representa cerca de 5% dos casos em crianças e 10% dos casos em adultos. As células expressam: HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22;
- LLA Comum: representa 75% dos casos pediátricos e 50% dos casos em adultos. Expressa CD10, CD22, CD19 e/ou CD20;
- LLA pré-B: corresponde a 15% das leucemias pediátricas e 10% dos casos em adultos. Apresenta a cadeia μ citoplasmática, CD10, CD19, CD20
- LLA B maduro: corresponde a 2% – 5% dos casos em adultos e crianças. Apresenta cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (Smlg), prognóstico desfavorável devido ao frequente envolvimento no Sistema Nervoso Central e à resposta deficiente à terapia;
- LLA pré-T: há expressão de CD3 citoplasmática (CD3c), e expressão na superfície celular de CD7, CD2, CD5 e TdT;
- LLA T-intermediário: expressão de CD3c, CD2 e CD1a, podem coexpressar CD4 e CD8;
- LLA-T maduro: expressão de CD2, CD5, CD7, CD3 e coexpressam CD4 e CD8.

Leucemias linfocítica agudas de fenótipo T ocorrem em 25% dos pacientes adultos e 15% em pacientes pediátricos (Farias & Castro, 2004).

1.2.2 Fatores de Risco

Estudos epidemiológicos em LLA investigaram a relação de possíveis fatores de risco como fatores ambientais, infecciosos e genéticos para determinar a etiologia da doença e apenas a radiação ionizante apresentou correlação significativa com o desenvolvimento de leucemia mielocítica aguda e LLA (Belson *et al.*, 2007). A amplitude do risco depende da dose de radiação, tempo de exposição à radiação e idade do paciente exposto e pode ocorrer também durante a concepção ou gestação (Mahoney *et al.*, 2004).

A LLA acomete mais frequentemente pacientes brancos e do sexo masculino (Onciu, 2009). Algumas doenças genéticas já foram associadas a LLA tais como síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, neurofibromatose e xeroderma pigmentoso (INCA, 2009).

1.2.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico laboratorial da LLA inicia com quadro sintomático que pode envolver fadiga, febre, dor óssea ou muscular, palidez cutâneo-mucosa, sangramentos anormais e dor generalizada (INCA, 2009). O hemograma apresenta contagem de leucócitos muito alta (acima de $100.000/\text{mm}^3$) e eventual presença de blastos,

enquanto o mielograma demonstra medula hipercelular com mais de 25% da sua celularidade composta por linfoblastos (Farias & Castro, 2004).

O tratamento para LLA é baseado na estratificação de risco do paciente, considerando fatores que afetam o prognóstico, como contagem inicial de leucócitos e idade ao diagnóstico. Pacientes acima de dez anos, em geral, apresentam prognóstico mais desfavorável, quando comparados aos pacientes menores de dez anos (Cooper e Brown, 2015).

A Doença Residual Mínima, que representa a presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica de doença, é de extrema importância na estratificação de risco e demonstra valor prognóstico, por meio da qual é possível monitorar a resposta do paciente ao tratamento quimioterápico, fazendo ajustes na administração de drogas quando necessário (Almeida et al., 2007). Atualmente, a DRM é avaliada no D15 da quimioterapia, e utilizado na estratificação de risco dos pacientes, junto a outros fatores já descritos acima. Salina e colaboradores (2016) demonstraram o potencial prognóstico da DRM no D8 do tratamento quimioterápico, antecipando em uma semana a estratificação de risco dos pacientes (Salina et al., 2016).

O protocolo indicado pelo Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI) têm sido empregado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o tratamento de LLA em pacientes pediátricos. O protocolo classifica os pacientes baseado na estratificação de risco de recidiva da doença, considerando fatores genéticos e hematológicos, e diferencia o tratamento para cada grupo de risco (Cazé et al, 2010).

Pacientes de LLA que recidivam frequentemente apresentam características de alto risco, como alta contagem de leucócitos e idade (maior risco quanto mais anos de idade), tornando casos de recorrência comuns em centros de tratamento de oncologia pediátrica (Schrappe *et al.*, 2012). Devido à dificuldades no tratamento, como resistência a quimioterápicos e rara correspondência com doador de medula óssea, a recidiva é uma das principais causas de morte por neoplasias em crianças (Ko *et al.*, 2010), evidenciando a necessidade de novas terapias adjuvantes e marcadores preditivos de resposta em LLA.

1.3 Neurotrofinas e Câncer

Neurotrofinas são uma família bem conservada de proteínas envolvidas tanto no crescimento e sobrevivência neuronais como na diferenciação e crescimento de tipos celulares de tecidos não neurais (Chao, 2003). Já foram identificadas em células do sistema imune, glândulas salivares, tecido adiposo, tecido pulmonar tecido cardíaco, glândula tireóide, rins, testículos, dentes e folículos pilosos (Sariola, 2001).

O Fator de Crescimento Neural (NGF) foi a primeira neurotrofina descoberta, em 1949. Mais tarde, outras neurotrofinas foram caracterizadas como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), a Neurotrofina 3 (NT-3) e a Neurotrofina 4 (NT-4) configurando as quatro neurotrofinas caracterizadas atualmente em humanos (Huang, 2001; Park and Poo 2013).

A ativação de vias de sinalização por neurotrofinas em diferentes sistemas ocorre mediante ligação a receptores relacionados à tropomiosina (TrKs), a saber, TrKA, TrKB e TrkC, ou ao receptor de neurotrofinas p75, um membro da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (rTNF) (Chao & Hempstead, 1995). À TrKA, TrKB e TrkC se ligam, respectivamente, a NGF, BDNF e NT-4, e NT-3; enquanto à p75^{NTR} se ligam todas as neurotrofinas com afinidade similar. As ligações de BDNF à TrKB e NGF à TrKA são de baixa afinidade, mas podem ser moduladas por dimerização, modificações estruturais ou associação com p75^{NTR}, que também atua como correceptor para receptores TrK. (Chao, 2003).

Neurotrofinas e seus receptores são expressos em muitos tipos de tumores, como câncer de mama (Yang et al, 2012), câncer colorretal (de Farias et al., 2011) e linfoma (Bellanger et al, 2011). O envolvimento de neurotrofinas em neoplasias abrange desde a tumorigênese (Li et al., 2009) até processos como migração (Fujikawa et al., 2012), resistência a *anoikis*, sobrevivência celular (Akil et al., 2011) e metástase (Sinkevicius et al., 2014).

1.4 Receptor p75^{NTR}

O receptor transmembrana p75^{NTR} é uma glicoproteína pertencente à superfamília dos receptores de fatores necrose tumoral (rTNF), capaz de se ligar às formas precursoras e maduras de neurotrofinas com afinidade similar (Lee *et al*, 2001). O receptor p75^{NTR} não possui atividade enzimática intrínseca, sua sinalização ocorre mediante ligação de proteínas intracelulares (Skeldal *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que p75^{NTR} pode formar complexos com receptores TrK, aumentando a afinidade de cada neurotrofina com seu receptor (Esposito *et al*, 2001), e também pode interagir com outros correceptores dependendo da localização celular, modificações pós-traducionais e estado de diferenciação celular (Lu *et al.*, 2005).

O receptor p75^{NTR} foi indicado como supressor tumoral em câncer gástrico (Jin *et al.*, 2007), de bexiga (Tabassum *et al.*, 2003) e de próstata (Khwaja *et al.*, 2006), por bloquear o ciclo celular e induzir apoptose. Na maior parte dos outros tumores, como melanoma, câncer de mama, glioma e carcinoma de células escamosas, p75^{NTR} foi indicado como favorável ao desenvolvimento tumoral, atuando em vias de proliferação, migração e metástases (Chopin et al, 2016).

Expressão de p75^{NTR} foi encontrada em gliomas de alto grau (Johnston et al., 2007), e também foi relacionada à prognóstico desfavorável em câncer de boca (Kiyosue et

al., 2013). Mais recentemente, p75^{NTR} foi indicado como marcador de células tronco tumorais em melanoma, carcinoma de esôfago e carcinoma de hipofaringe (Tomellini et al., 2014).

A expressão de p75^{NTR} foi reportada em 8% dos pacientes adultos portadores de leucemias agudas (Beutel et al., 2005). Outro estudo realizado na Europa investigou a expressão de p75^{NTR} em pacientes pediátricos de LLA pré B, em que pacientes diagnosticados como baixo risco ao diagnóstico exibiram maior expressão de p75^{NTR} quando comparados à pacientes diagnosticados como alto risco (Troeger et al., 2007). Entretanto, o envolvimento do receptor p75^{NTR} nos demais subtipos de LLA em pacientes pediátricos está pouco elucidado.

2. JUSTIFICATIVA

A LLA é a neoplasia pediátrica mais comum e é a primeira causa de morte por doença entre crianças no Brasil. Além dos cerca de 30% de pacientes refratários ao tratamento, cerca de 15% dos pacientes apresentam recidivas tardias, além de sequelas do tratamento quimioterápico intensivo. Portich e grupo analisaram a expressão de BDNF em amostras medula óssea de pacientes com LLA e correlacionaram baixos níveis de BDNF a pior prognóstico, ressaltando o envolvimento de BDNF na resposta à quimioterapia e salientando a importância de se investigar os receptores dessa molécula. Devido à necessidade de desenvolvimento de novos fatores prognósticos, terapias adjuvantes e fármacos neuroprotetores e, visto que o receptor neurotrófico p75 já foi apontado como potencial fator prognóstico em outras neoplasias, torna-se plausível avaliar o papel de p75^{NTR} em LLA pediátrica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão do receptor p75^{NTR} em pacientes pediátricos de LLA no momento do diagnóstico e durante a fase de indução, no dia 35 (D35), correlacionando com aspectos clínicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de p75^{NTR} em amostras de pacientes com DRM positiva e em pacientes com DRM negativa no D35;
- Avaliar a expressão de p75^{NTR} em amostras de pacientes de alto e de baixo risco;

4. ARTIGO

Formato exigido pelo periódico “*Journal of Pediatric Hematology/Oncology*” (<http://journals.lww.com/jpho-online>)

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR p75^{NTR} EM PACIENTES PEDIÁTRICOS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

Lívia Fratini Dutra¹, Caroline Brunetto de Farias², Rafael Roesler¹, Algemir Lunardi Brunetto², Lauro José Gregianin^{1,3}, Jiseh Loss³

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul
2. Instituto do Câncer Infantil, Porto Alegre, Rio Grande do Sul
3. Serviço de Oncologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Endereço para correspondência:

Dra. Caroline Brunetto de Farias
Laboratório de Câncer e Neurobiologia, 2º andar Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Bairro Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brasil
Telefone: 33597616
Email: carolbfarias@gmail.com

Instituições financiadoras:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PPSUS 1245-2551/13-0)
Instituto do Câncer Infantil
FIPE – HCPA (projeto 130023)

Resumo: A leucemia linfocítica aguda é o tumor pediátrico mais comum atualmente. Apesar do sucesso de protocolos de tratamento empregados atualmente, que consideram o risco de cada paciente e adotam o protocolo ideal, cerca de 30% dos pacientes são refratários ao tratamento e aproximadamente 15% dos pacientes recidivam tardiamente. Na busca por novos fatores preditivos de resposta e terapias adjuvantes, o Receptor Neurotrófico p75 (p75^{NTR}) vêm sendo elucidado em diversos tumores. O objetivo desse estudo foi investigar o papel de p75^{NTR} em pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias linfocíticas agudas. Através da técnica de Reação em Cadeira de Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR), a expressão de p75^{NTR} de 18 pacientes foram analisados em dois momentos da quimioterapia. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre expressão de p75^{NTR} e momento da quimioterapia, gênero, idade ao diagnóstico, risco ou doença residual mínima. Espera-se aumentar o número de pacientes incluídos no estudo para melhor elucidar o papel do receptor p75^{NTR} em leucemias linfocíticas agudas.

Palavras-chave: leucemia linfocítica aguda, câncer infantil, p75^{NTR}, neurotrofinas

Introdução

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é o tipo de câncer que mais acomete crianças, representando a principal causa de morte por doença em indivíduos de até 19 anos, no Brasil [1]. A LLA tem seu desenvolvimento na medula óssea, com proliferação exacerbada de linfoblastos, que são incapazes de diferenciar até leucócitos funcionais, acumulando na medula óssea em diferentes estágios de maturação e caracterizando os diferentes subtipos de LLA [2]. Para o sucesso do tratamento quimioterápico, uma estratificação de risco é realizada com os pacientes de LLA, adotando o protocolo mais adequado para cada paciente [3]. Ainda assim, cerca de 30% dos pacientes são refratários ao tratamento, e 15% dos pacientes que evoluem para remissão, apresentam recidivas tardias da doença [4].

Neurotrofinas são proteínas de sinalização celular, primeiramente descritas no sistema nervoso e caracterizadas atualmente em diversos tecidos, que atuam na proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares [5]. A sinalização de neurotrofinas é composta pelos seus quatro membros: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Fator de Crescimento Neural (NGF), Neurotrofina 3 (NT-3) e Neurotrofina 4 (NT-4) e pelos receptores relacionados à tropomiosina (TrK) TrKA, TrKB e TrKC e pelo receptor $p75^{NTR}$, membro da família dos receptores de Fatores de Necrose Tumoral (rTNF) [6].

A expressão de $p75^{NTR}$ já foi reportada em diversos tumores, como câncer de mama, câncer de bexiga, melanoma, linfoma e carcinoma renal [7]. Em neoplasias, o receptor $p75^{NTR}$ demonstrou estar envolvido tanto em indução de apoptose por bloqueio do ciclo celular como em processos de proliferação celular, migração e metástases [8].

Devido à necessidade de fatores preditivos de resposta e terapias adjuvantes em LLA e ao potencial papel do receptor $p75^{NTR}$ em neoplasias, investigamos a expressão desse receptor em amostras de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Materiais e Métodos

Pacientes

Foram utilizadas amostras de medula óssea de 18 pacientes atendidos no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e diagnosticados com Leucemia Linfocítica Aguda, no período de janeiro de 2014 a agosto de 2016. Os critérios de exclusão para o estudo foram: pacientes diagnosticados com leucemia mielocítica, pacientes que já haviam realizado tratamento quimioterápico prévio e pacientes maiores de 19 anos. O Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo II) foi assinado pelo responsável legal do paciente.

Amostras de medula óssea

Amostras de medula óssea foram coletadas em tubo EDTA apenas mediante solicitação médica, por profissionais da equipe do Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA e uma alíquota foi cedida ao estudo. As avaliações em que biópsia de medula óssea precisou ser coletada ocorreram no diagnóstico (D0) e no dia 35 da indução (D35).

Extração de RNA e Preparação de cDNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit Pure Link® (Life Technologies, EUA), conforme protocolo descrito pelo fabricante, seguido pela quantificação em NanoDrop nas absorvâncias de 260nm e 280nm. Para a reação de transcriptase reversa foram utilizadas 50ng de RNA. Os reagentes: enzima transcriptase reversa, tampão 10x, Random hexameros, dNTP (10nM), MgCl₂ (25nM) e Ditiotreitoliol (DTT) compõe o kit GoScript™ (Promega, EUA), utilizado de acordo com orientações do fabricante.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase foi realizada utilizando kit SuperScript III® (Invitrogen, EUA), conforme orientações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 1,5mM MgCl₂, 0,1 µM de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 1U enzima polimerase e 1 µL de cDNA. Os primers para β-actina e p75^{NTR} foram desenhados conforme sequência correspondente no Gene Bank: para β-actina foram utilizados os primers senso 5'-GAGACCTTCAACACCCCAG-3' e anti-senso 5'-GCTACAGCTTCACCAGCAG-3' e temperatura de anelamento de 59°C. Para amplificação de p75^{NTR} foram utilizados os primers senso 5'-ATCCCTGGCCGTTGGATTAC-3' e anti-senso 5'-GACAGGGATGAGGTTGTCTCGG-3', e temperatura de anelamento de 60°C.

Todas as reações apresentaram um volume final de 20 µL, utilizando 35 ciclos para amplificação. Cada ciclo de amplificação consistiu de 30 segundos a 95°C, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundos para o par primers de p75^{NTR} e a 59°C para o par de primers de β-actina, e extensão dos primers a 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72 ° C for 5 min. Os produtos de p75^{NTR} (192 pb) β-actina (190 pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.0% contendo brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta. O tamanho do fragmento foi confirmado utilizando um marcador de peso molecular. A expressão relativa de p75^{NTR} foi determinada por análise densitométrica pelo software ImageJ 1.6 para Windows®, dividindo a mensuração da banda de p75^{NTR} pela mensuração da banda de β-actina do respectivo paciente.

Análise Estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, para amostras independentes. O intervalo de confiança empregado foi de 95%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS 24.

Resultados

Características da amostra

Entre os 18 pacientes observamos predominância do diagnóstico LLA-B Comum e DRM negativa (Tabela 3). Durante o estudo, somente um paciente foi a óbito.

Expressão de p75^{NTR} encontrada em todas as amostras analisadas

A expressão de p75^{NTR} foi detectada em 100% dos pacientes analisados, nos dois momentos da quimioterapia, D0 (diagnóstico) e D35, avaliados.

A expressão de p75^{NTR} não varia entre D0 e D35

A expressão de p75^{NTR} foi comparada entre os momentos do diagnóstico e do dia 35 da indução do tratamento quimioterápico. Não foi observada variação estatisticamente significativa entre os dois momentos (Figura 1).

A expressão de p75^{NTR} entre pacientes com DRM positiva e DRM negativa não difere

A análise da expressão de p75^{NTR} no momento do diagnóstico entre pacientes que apresentaram doença residual mínima positiva não obteve diferença estatisticamente significativa (Figura 2).

Expressão de p75^{NTR} ao diagnóstico não varia de acordo com o risco

Análise da expressão de p75^{NTR} no D0 em pacientes estratificados como alto e baixo risco demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

Expressão de p75^{NTR} não varia com a idade

Visto que um dos fatores preditores de risco é a idade ao diagnóstico, investigamos se a expressão de p75 no momento do diagnóstico varia entre pacientes maiores de 9 anos e entre pacientes menores de 9 anos de idade. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa (Figura 4).

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes pediátricos diagnosticados com LLA incluídos no estudo.

Pacientes		n= 18
Gênero	Masculino	10 (55,5%)
	Feminino	8 (44,5%)
Idade ao diagnóstico		6,49 ± 4,64
Risco	Alto	8 (44,5%)
	Baixo	10 (55,5%)
Diagnóstico	LLA B Comum	11 (61%)
	LLA Pré B	4 (22%)
	LLA Pré T	3 (16%)
DRM	Positiva	5 (28%)
	Negativa	13 (72%)
Protocolo	GTLI 2009 Alto Risco	7 (39%)
	GTBLI 2009 Baixo Risco/ Intermediário	11 (61%)
Expressão de p75 ^{NTR}	Positiva	18 (100%)
	Negativa	0 (0%)

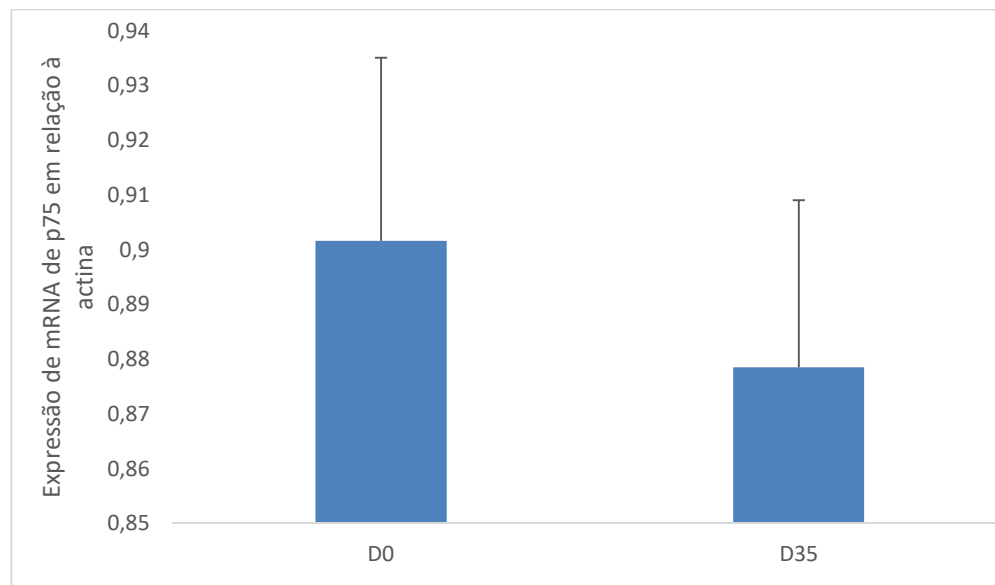


Figura 1. Expressão de p75 em pacientes pediátricos de LLA em dois momentos do tratamento quimioterápico

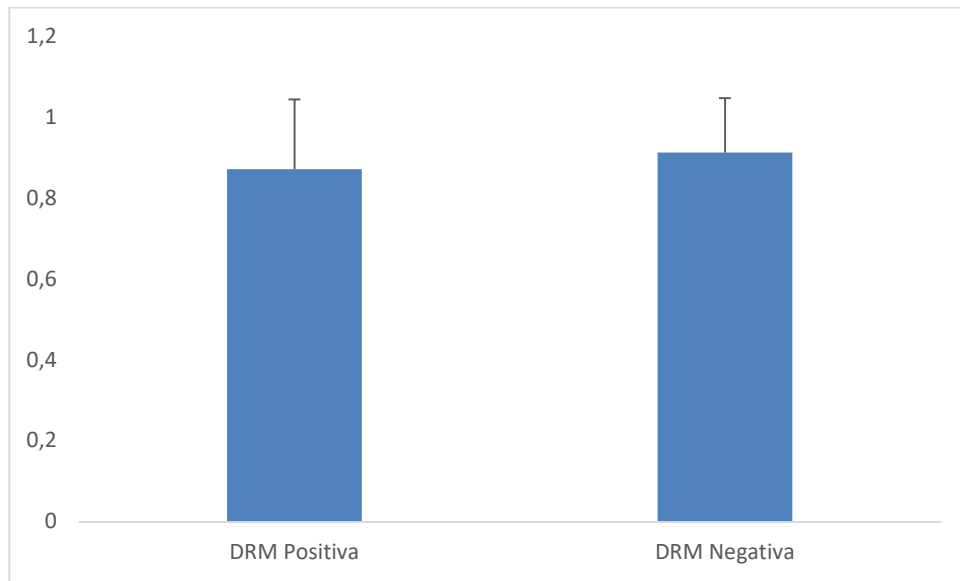


Figura 2. Expressão de p75 em D0 entre pacientes pediátricos diagnosticados com LLA com DRM positiva e negativa.

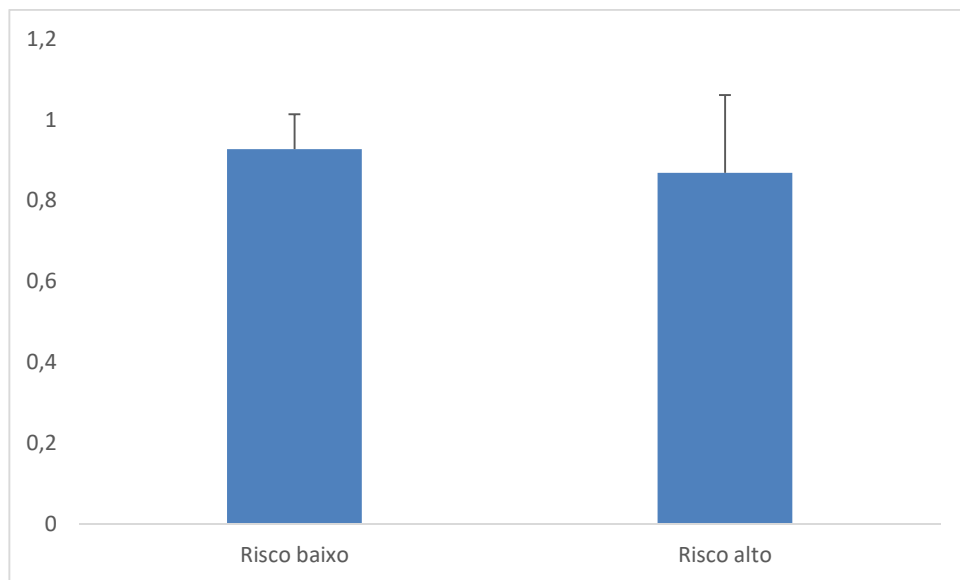


Figura 3. Expressão de p75 entre pacientes pediátricos de LLA estratificados em alto risco e baixo risco.

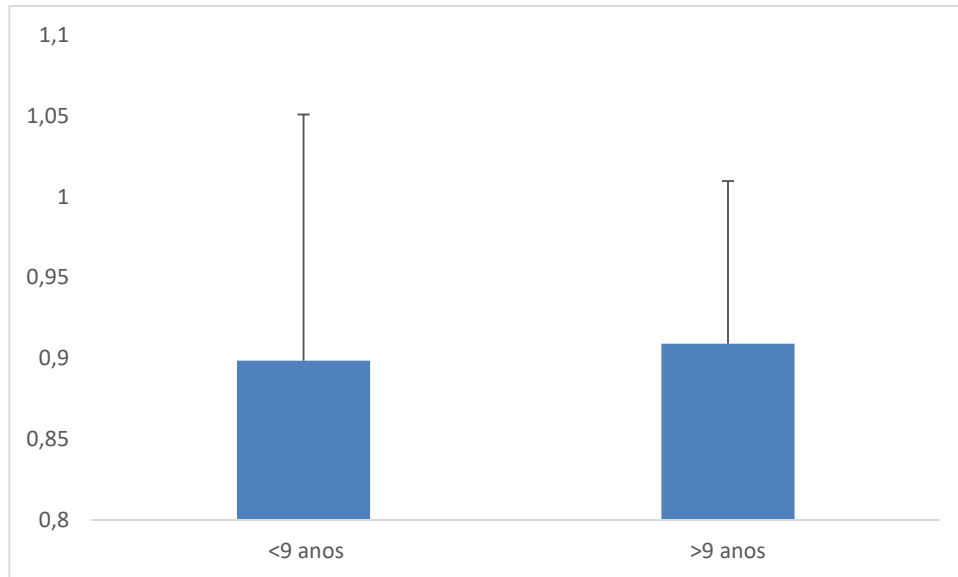


Figura 4. Expressão de p75 de acordo com a idade dos pacientes.

Discussão

O receptor p75^{NTR} já foi descrito em diversos tipos tumorais modulando tanto processos que favorecem o desenvolvimento tumoral quanto processos que limitam o desenvolvimento neoplásico [8]. Devido às diferenças entre tumores pediátricos e tumores adultos, quanto ao surgimento, fatores de risco associados, acúmulos de mutações, velocidade de desenvolvimento e de resposta ao tratamento, é evidente que as neoplasias devem ser estudadas separadamente.

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar expressão de p75^{NTR} em 100% dos pacientes pediátricos analisados. O envolvimento de p75^{NTR} em leucemia aguda já havia sido descrito em estudo com 101 adultos diagnosticados com leucemia linfocítica aguda ou leucemia mielocítica aguda, além de reportar a expressão de p75^{NTR} em um paciente pediátrico dentre quatro recrutados para o estudo [9].

Pela primeira vez, demonstramos a expressão de p75^{NTR} em todos os subtipos de LLA analisados. Em 2007, Troegger e grupo correlacionaram alta expressão de p75^{NTR} com bom prognóstico em pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-pré B.

Mais estudos com coortes maiores trarão a possibilidade de caracterizar o receptor p75 como marcador prognóstico. A correlação da expressão de p75^{NTR} com idade ao diagnóstico, que contribui para a estratificação de risco, e da doença residual mínima são avaliações promissoras. Além disso, o acompanhamento dos pacientes por um segmento temporal maior se faz necessário, a fim de avaliar casos de recidiva e sua possível correlação com expressão de p75^{NTR}.

A principal limitação do estudo reside no tamanho amostral. Apenas 18 pacientes avaliados em dois momentos do diagnóstico são pouco

representativos de uma população e limitam análises estatísticas mais adequadas.

Referências

1. Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2008. BRASIL, Ministério da Saúde. “Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade”. Brasília, DF, 2008
2. Farias, Mariela Granero, and Simone Martins De Castro. 2004. “Diagnóstico Laboratorial Das Leucemias Linfóides Agudas.” *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial* 40 (2): 91–98
3. Cazé, Marcelino Oliveira, Denise Bueno, and Maria Elisa Ferreira dos Santos. 2010. “Estudo Referencial de um Protocolo Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil.” *Rev HCPA* 30 (1): 5–12
4. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. “Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update”. *Journal of clinical oncology* 29(5):551–65
5. Chao, Moses V. 2003. “Neurotrophins and Their Receptors: A Convergence Point for Many Signalling Pathways.” *Nature Reviews. Neuroscience* 4 (April): 299–309
6. Huang, Eric J, and Louis F Reichardt. 2001. “Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function.” *Annual Review of Neuroscience* 24 (1): 677–736
7. Cruz-Morcillo, Miguel A. De la, Julien Berger, Ricardo Sánchez-Prieto, Sofiane Saada, Thomas Naves, Angélique Guillaudeau, Aurélie Perraud, et al. 2016. “p75 Neurotrophin Receptor and pro-BDNF Promote Cell Survival and Migration in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.” *Oncotarget* 5 (23): 34480–97.
8. Chopin, Valérie, Chann Lagadec, Robert-alain Toillon, and Xuefen Le Bourhis. 2016. “Neurotrophin Signaling in Cancer Stem Cells.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 1859–70.
9. Beutel, Gernot, Johann Meyer, Liping Ma, Songmei Yin, Matthias Eder, Nils Von Neuhoff, Ludwig Wilkens, et al. 2005. “Expression of the p75 Neurotrophin Receptor in Acute Leukaemia.” *British Journal of Haematology* 131 (1): 67–70

5. REFERÊNCIAS

Akil, Hussein, Aurélie Perraud, Carole Mélin, Marie-Odile Jauberteau, and Muriel Mathonnet. 2011. “**Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival.**” Edited by Mark P. Mattson. *PLoS ONE* 6 (9): e25097. doi:10.1371/journal.pone.0025097.

Almeida, Priscilla S R, and Vera Aparecida Saddi. 2007. “**Monitoramento de Doença Residual Mínima Em Leucemia Mielóide Crônica Por PCR Em Tempo Real.**” *Revista Brasileira Hematologia E Hemoterapia* 29 (4): 382–86. doi:10.1590/S1516-84842007000400012.

Bellanger, Cynthia, Lydie Dubanet, Marie Claude Lise, Anne Laure Fauchais, Dominique Bordessoule, Marie Odile Jauberteau, and Danielle Troutaud. 2011. **“Endogenous Neurotrophins and Trk Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Lines Are Involved in Sensitivity to Rituximab-Induced Apoptosis.”** *PLoS ONE* 6 (11). doi:10.1371/journal.pone.0027213.

Belson, Martin, Beverly Kingsley, and Adrienne Holmes. 2007. **“Risk Factors for Acute Leukemia in Children : A Review.”** *Environmental Health Perspectives* 138 (1): 138–45. doi:10.1289/ehp.9023.

Beutel, Gernot, Johann Meyer, Liping Ma, Songmei Yin, Matthias Eder, Nils Von Neuhoff, Ludwig Wilkens, et al. 2005. **“Expression of the p75 Neurotrophin Receptor in Acute Leukaemia.”** *British Journal of Haematology* 131 (1): 67–70. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05717.x.

Cazé, Marcelino Oliveira, Denise Bueno, and Maria Elisa Ferreira dos Santos. 2010. **“Estudo Referencial de um Protocolo Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil.”** *Rev HCPA* 30 (1): 5–12.

Chao, Moses V., and Barbara L. Hempstead. 1995. **“p75 and Trk: A Two-Receptor System.”** *Trends in Neurosciences* 18 (7): 321–26. doi:10.1016/0166-2236(95)93922-K.

Chao, Moses V. 2003. **“Neurotrophins and Their Receptors: A Convergence Point for Many Signalling Pathways.”** *Nature Reviews. Neuroscience* 4 (April): 299–309. doi:10.1038/nrn1078.

Chopin, Valérie, Chann Lagadec, Robert-alain Toillon, and Xuefen Le Bourhis. 2016. **“Neurotrophin Signaling in Cancer Stem Cells.”** *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 1859–70. doi:10.1007/s00018-016-2156-7.

Cooper, Stacy L., and Patrick a. Brown. 2015. **“Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.”** *Pediatric Clinics of North America* 62 (1). Elsevier Inc: 61–73. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.006.

De Farias, Caroline Brunetto, Denis Broock Rosemberg, Tiago Elias Heinen, Patricia Koehler-Santos, Ana Lucia Abujamra, Flávio Kapczinski, Algimir Lunardi Brunetto, et al. 2011. **“BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer.”** *Oncology* 79 (5–6): 430–39. doi:10.1159/000326564.

DeVita, V. T., Rosenberg, S. A., & Hellman, S. 2014. **Cancer, principles and practice of oncology.** 10th ed. New York: Lippincott-Raven; 1997:2083-2091.

Esposito, Darren, Pulin Patel, Robert M. Stephens, Pilar Perez, Moses V. Chao, David R. Kaplan, and Barbara L. Hempstead. 2001. **“The Cytoplasmic and Transmembrane Domains of the p75 and Trk A Receptors Regulate High Affinity Binding to Nerve Growth Factor.”** *Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 32687–95. doi:10.1074/jbc.M011674200.

Farias, Mariela Granero, and Simone Martins De Castro. 2004. **“Diagnóstico Laboratorial Das Leucemias Linfóides Agudas.”** *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial* 40 (2): 91–98. doi:10.1590/S1676-24442004000200008.

Fujikawa, Hiroyuki, Koji Tanaka, Yuji Toiyama, Susumu Saigusa, Yasuhiro Inoue, Keiichi Uchida, and Masato Kusunoki. 2012. **“High TrkB Expression Levels Are Associated with Poor Prognosis and EMT Induction in Colorectal Cancer Cells.”** *Journal of Gastroenterology* 47 (7): 775–84. doi:10.1007/s00535-012-0532-0.

Johnston, Angela L M, Xueqing Lun, Jennifer J. Rahn, Abdelhamid Liacini, Limei Wang, Mark G. Hamilton, Ian F. Parney, et al. 2007. **“The p75 Neurotrophin Receptor Is a Central Regulator of Glioma Invasion.”** Edited by Christopher Kemp. *PLoS Biology* 5 (8): e212. doi:10.1371/journal.pbio.0050212.

Hoffbrand, A. V. - Moss, P. A. H. 2013. **Fundamentos Em Hematologia.** 6ª Edição. Porto Alegre: ARTMED.

Huang, Eric J, and Louis F Reichardt. 2001. **“Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function.”** *Annual Review of Neuroscience* 24 (1): 677–736. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2008. BRASIL, Ministério da Saúde. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Brasília, DF, 2008

Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2016. BRASIL, Ministério da Saúde. **Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil**. Brasília, DF, 2016

Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2009. BRASIL, Ministério da Saúde. **“Diagnóstico Precoce Do Câncer Na Criança E No Adolescente”**. Brasília, DF.

Kiyosue, Takahiro, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Mitsuhiro Hirano, Teppei Jinno, Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura, Kazunari Oobu, and Seiji Nakamura. 2013. **“Immunohistochemical Location of the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR) in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma.”** *International Journal of Clinical Oncology* 18 (1): 154–63. doi:10.1007/s10147-011-0358-4.

Ko RH, Ji L, Barnette P, Bostrom B, Hutchinson R, Raetz E, et al. 2010. **“Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study”**. *J Clin Oncol*; 28(4):648–54. doi: 10.1200/JCO.2009.22. 2950

Lee, R, P Kermani, KK Teng, and BL Hempsted. 2001. **“Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins.”** *Science* 294 (November): 1945–48. doi:10.1126/science.1065057.

Li, Zhixiong, Gernot Beutel, Mathias Rhein, Johann Meyer, Christian Koenecke, Thomas Neumann, Min Yang, et al. 2009. **“High-Affinity Neurotrophin Receptors and Ligands Promote Leukemogenesis.”** *Blood* 113 (9): 2028–37. doi:10.1182/blood-2008-05-155200.

Lu, Bai, Petti T Pang, and Newton H Woo. 2005. **“The Yin and Yang of Neurotrophin Action.”** *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (8): 603–14. doi:10.1038/nrn1726.

Mahoney, M C, K B Moysich, P L McCarthy Jr., R C McDonald, V F Stepanenko, R W Day, and A M Michalek. 2004. **“The Chernobyl Childhood Leukemia Study:**

Background & Lessons Learned.” *Environ Health* 3 (1): 12. doi:10.1186/1476-069X-3-12.

Oeffinger, Kevin C, Ann C Mertens, Charles a Sklar, Toana Kawashima, Melissa M Hudson, Anna T Meadows, Debra L Friedman, et al. 2006. **“Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer.”** *The New England Journal of Medicine* 355 (15): 1572–82. doi:10.1056/NEJMsa060185.

Onciu, Mihaela. 2009. **“Acute Lymphoblastic Leukemia.”** *Hematology/Oncology Clinics of North America* 23 (4). Elsevier Ltd: 655–74. doi:10.1016/j.hoc.2009.04.009.

Portich, Júlia Plentz, Mirela Severo Gil, Rafael Pereira Dos Santos, Bruno Kilpp Goulart, Maria Beatriz Cardoso Ferreira, Jiseh Fagundes Loss, Lauro José Gregianin, et al. 2016. **“Low Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Are Associated with Active Disease and Poor Prognosis in Childhood Acute Leukemia.”** *Cancer Biomarkers* 17 (3): 347–52. doi:10.3233/CBM-160646.

Pritchard-Jones K, Pieters R, Reaman GH, et al. 2013 **Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries.** *Lancet Oncol.*; 14(3):e95– e103.

Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. **“Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update”.** *Journal of clinical oncology* 29(5):551–65. doi: 10.1200/jco.2010.30.7405

Salina, Thais Ditolvo da Costa, Yvelise Antunes Ferreira, Eliana Brasil Alves, Cristina Motta Ferreira, Erich Vinícius De Paula, Marcelo Távora Mira, and Leny da Mota Passos. 2016. **“Role of Peripheral Blood Minimum Residual Disease at Day 8 of Induction Therapy in High-Risk Pediatric Patients with Acute Lymphocytic Leukemia.”** *Scientific Reports* 6 (April). Nature Publishing Group: 31179. doi:10.1038/srep31179.

Sariola, H. 2001. **“The Neurotrophic Factors in Non-Neuronal Tissues.”** *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (8): 1061–66. doi:10.1007/PL00000921.

Schrappé, Martin, Stephen P. Hunger, Ching-Hon Pui, Vaskar Saha, Paul S. Gaynon, André Baruchel, Valentino Conter, et al. 2012. **“Outcomes after Induction**

Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.” *New England Journal of Medicine* 366 (15): 1371–81. doi:10.1056/NEJMoa1110169.

Sinkevicius, Kerstin W, Christina Kriegel, Kelly J Bellaria, Jaewon Lee, Allison N Lau, Kristen T Leeman, Pengcheng Zhou, et al. 2014. **“Neurotrophin Receptor TrkB Promotes Lung Adenocarcinoma Metastasis.”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (28): 10299–304. doi:10.1073/pnas.1404399111.

Skeldal, Sune, Dusan Matusica, Anders Nykjaer, and Elizabeth J. Coulson. 2011. “Proteolytic Processing of the p75 Neurotrophin Receptor: A Prerequisite for Signalling?: Neuronal Life, Growth and Death Signalling Are Crucially Regulated by Intra-Membrane Proteolysis and Trafficking of p75NTR.” *BioEssays* 33 (8): 614–25. doi:10.1002/bies.201100036.

Smith, Malcolm A., Nita L. Seibel, Sean F. Altekruse, Lynn A G Ries, Danielle L. Melbert, Maura O’Leary, Franklin O. Smith, and Gregory H. Reaman. 2010. **“Outcomes for Children and Adolescents with Cancer: Challenges for the Twenty-First Century.”** *Journal of Clinical Oncology* 28 (15): 2625–34. doi:10.1200/JCO.2009.27.0421.

Smith, M. A., Altekruse, S. F., Adamson, P. C., Reaman, G. H., & Seibel, N. L. 2014. **Declining Childhood and Adolescent Cancer Mortality.** *Cancer*, 120(16), 2497–2506. <http://doi.org/10.1002/cncr.28748.Declining>

Tomellini, Elisa, Chann Lagadec, Renata Polakowska, and Xuefen Le Bourhis. 2014. **“Role of p75 Neurotrophin Receptor in Stem Cell Biology: More than Just a Marker.”** *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (13): 2467–81. doi:10.1007/s00018-014-1564-9.

Troeger, Anja, Sonja Gudowius, Gabriele Escherich, Monique L. Den Boer, Ludmila Glouchkova, Birgit Ackermann, Roland Meisel, et al. 2007. **“High Nerve Growth Factor Receptor (p75NTR) Expression Is a Favourable Prognostic Factor in Paediatric B Cell Precursor-Acute Lymphoblastic Leukaemia.”** *British Journal of Haematology* 139 (3): 450–57. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06818.x.

Yang, Xiaomei, Tracey A. Martin, and Wen G. Jiang. 2012. **“Biological Influence of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Breast Cancer Cells.”** *International Journal of Oncology* 41 (4): 1541–46. doi:10.3892/ijo.2012.1581.